



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی افضلی پور

پایان نامه مقطع دکتری تخصصی رشته انگل شناسی پزشکی

عنوان:

بررسی بیان ژن های گیرنده شبه Toll (TLR) سطح ماکروفاژ، سایتوکاین  $\text{TNF-}\alpha$  و ژن های مقاومت انگل در جدایه های عدم پاسخ و حساس به درمان لیشمانیوز پوستی نوع شهری در کانون های اندمیک استان کرمان

توسط: راضیه توکلی علیایی

استاد راهنما: دکتر ایرج شریفی

استاد مشاور: دکتر علی افگار

سال تحصیلی: ۹۸-۱۳۹۷

## چکیده

**مقدمه و اهداف:** لیشمانیازیس پوستی یکی از مهم ترین بیماری های انگلی منتقله از بندپایان است که ایران از مناطق اندمیک به حساب می آید و شیوع آن در کشور رو به افزایش است. مقاومت به آنتی موان ها یک عامل اساسی در شکست درمان در لیشمانیازیس پوستی آنتروپونوتیک (ACL) است. شناسایی مکانیسم های متقابل میزبان و انگل و همچنین شناخت مارکر های دقیق ملکولی انگل لیشمانیا تروپیکا برای تمایز ایزوله های شکست درمان و حساس در جهت طراحی استراتژی های افزایش اثربخشی دارو ضروری هستند. در مطالعه حاضر، بیان ژن های مقاومت انگلی و همچنین بیان TLRs، بعضی از سایتوکاین ها و فعالیت آنزیم آرژیناز در بیماران شکست درمان در مقایسه با بیماران حساس آلوده به لیشمانیا تروپیکا بررسی شد.

**مواد و روش ها:** از هر دو گروه بیماران حساس و شکست درمان که در دامنه سنی بین ۶ تا ۶۰ سال قرار داشتند، نمونه گیری از زخم سالک و همچنین نمونه خون انجام شد. در نمونه های انگلی کشت داده شده، بیان پنج ژن مقاومت AQP1،  $\gamma$ -GCS، MRPA، TDR1 و TR در ایزوله های بالینی لیشمانیا تروپیکا در هر دو گروه در مقایسه با سویه استاندارد حساس و مقاوم ارزیابی شدند. بیان ژن های TLR2، TLR4، TLR9، TNF- $\alpha$  و iNOS در ماکروفاژهای خون محیطی مواجهه شده با لیشمانیا تروپیکا با روش quantitative real-time PCR بررسی شدند. همچنین سطح فعالیت آرژیناز و بیان آن در پروماستیگوت های کشت شده و رسوب ماکروفاژهای جدا شده از بیماران تعیین شد.

**نتایج:** آنالیز بیان ژن، کاهش بیان AQP1 (1.9 fold)،  $\gamma$ -GCS (1.7 fold) و TDR1 (3.55 fold) در ایزوله های شکست درمان در مقایسه با ایزوله های حساس نشان داد. میانگین سطح بیان ژن MRPA در گروه شکست درمان، افزایش قابل توجهی (1.9 fold) نشان داد. ماکروفاژهای آلوده به لیشمانیا تروپیکا، افزایش سطح بیان هر سه TLR و TNF- $\alpha$  و کاهش بیان iNOS در مقایسه با ماکروفاژهای آلوده نشده در هر دو گروه بیماران نشان دادند. کاهش معنادار بیان TLR2 و TNF- $\alpha$  و همچنین افزایش بیان TLR9 در ایزوله های شکست درمان در مقایسه با ایزوله های حساس دیده شد. به علاوه، سطح آرژیناز افزایش معناداری در پروماستیگوت های جدا شده و ماکروفاژهای آلوده شده در بیماران شکست درمان در مقایسه با بیماران حساس نشان داد.

**نتیجه گیری:** آنالیز بیان مجموعه ای از ژن های کارآمد می تواند برای شناسایی ماکرهای افتراقی بین انگل های بی پاسخ و پاسخ دهنده به درمان با آنتی موان مفید باشند. کاهش بیان TLR2، TLR4، TNF- $\alpha$  و iNOS و افزایش بیان TLR9 و آرژیناز در ماکروفاژهای آلوده در بیماران شکست درمان، ممکن است در شدت بیماری و بی پاسخی به درمان با گلوکانتیم نقش داشته باشند.

**کلمات کلیدی:** لیشمانیازیس، مقاومت به آنتی موان، مارکرهای ژنتیکی، رسپتورهای شبه Toll، سطح آرژیناز و

Quantitative real-time PCR

## Abstract

**Background and objectives:** Cutaneous leishmaniasis (CL) is one of the most important vector-borne parasitic diseases, highly endemic in Iran, and its prevalence is increasing all over the country. Resistance to antimonials is a fundamental determinant of treatment failure in anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL). Detection of the mechanism of host/parasite interactions and reliable molecular markers is critical to distinguish unresponsive and responsive isolates for consolidating strategies to monitor drug efficacy. In the present study, the expression of parasite resistance genes and toll-like receptors (TLRs), some cytokines and also arginase (ARG) activity from Glucantime unresponsive in comparison to responsive patients infected with *Leishmania tropica* was investigated.

**Materials and methods:** In this case-control study, lesion smears and blood samples were collected from unresponsive and responsive patients with the range of 6-60 years. In cultured isolates, the expression of five major antimony resistance-associated genes of AQP1,  $\gamma$ -GCS, MRPA, TR and TDR1 was assessed in *L. tropica* field isolates in comparison with sensitive and resistant reference strains. Gene expression of TLR2, TLR4, TLR9, TNF- $\alpha$  and iNOS was analyzed in *L. tropica*-exposed macrophages by quantitative real-time PCR. Also, the level of ARG activity and its expression in both cultured promastigotes and the lysates of macrophages was determined.

**Results:** Gene expression analysis showed the down-regulation of AQP1,  $\gamma$ -GCS and TDR1 by a factor of 1.9, 1.7 and 3.55, respectively, in unresponsive isolates vs. responsive ones. The average levels of MRPA gene expression increased by a factor of 1.9 in the unresponsive group. *L. tropica*-exposed monocytes represented higher expression of all three TLRs and TNF- $\alpha$  and lower expression of iNOS compared to unexposed ones in both groups of patients. Results revealed a significant down-regulation of TLR2 and TNF- $\alpha$  and up-regulation of TLR9 expression in unresponsive isolates in comparison to responsive ones. Besides, ARG level showed a significant increase in *L. tropica*-stimulated monocytes and cultured promastigotes from unresponsive isolates versus responsive ones.

**Conclusion:** Expression analysis of a set of influential genes can be beneficial to identify distinctive biomarkers between antimony-unresponsive and responsive parasites. The decreased TLR2, TLR4, TNF- $\alpha$  and iNOS and the increased level of TLR9 expression and ARG activity in *L. tropica*-exposed monocytes from unresponsive isolates, might possibly be involved in the severity of the disease and leading to Glucantime unresponsiveness.

**Keywords:** Leishmaniasis, Antimonial resistance, Genetic markers, Toll like receptors, Arginase level, Real-time qPCR



**Kerman University of Medical Sciences**

**Afzalipour Faculty of Medicine**

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Ph.D Degree  
of Medical Parasitology

**Title:**

**Evaluation of macrophage surface TLRs, TNF- $\alpha$  cytokine and parasite-resistance genes expression in unresponsive and responsive clinical isolates of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in endemic foci of Kerman province**

**By:**

**Razieh Tavakoli Oliace**

**Supervisor:**

**Dr. Iraj Sharifi**

**Advisor:**

**Dr. Ali Afgar**

**Year:**

**2018**

